Aus dem Hygienisch-Bakteriologischen Institut der
Militärärztlichen Akademie
Leiter: Oberstabsarzt Prof. Dr. Sartorius.

Versuche mit Trockenkomplement, Trocken-Testserum und Trockenbakterien

INAUGURAL-DISSERTATION

**zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
an der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin**

vorgelegt von

Joachim Karitzky
aus Velgast, Kr. Franzburg.

Tag der Promotion: 12. Juni 1941

Buchdruckerei und Verlagsanstalt Rudolph Pfau, Berlin NW 7, Luisenstraße 21.

M 83

Gedruckt mit Genehmigung

der

Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Kreuz

Referent: Prof. Dr. Sartorius

Korreferent: Prof. Dr. Zeiß.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Mit der wissenschaftlichen Erforschung der den menschlichen und tierischen Seren innewohnenden Eigenschaften, insbesondere aber der in den Seren bei Immunisierungsvorgängen auftretenden Antikörper verknüpfte sich von vornherein die wichtige Frage ihrer Haltbarkeit bzw. künstlichen Erhaltung außerhalb des Organismus zum Zweck ihrer praktischen Nutzung unter den verschiedenartigsten Umständen. Hierbei zeigte es sich bald, daß, soweit die Konservierung in flüssigem Zustand angestrebt wurde, für die immunkörperhaltigen Seren unter mancherlei versuchten Mitteln ein gewisser Zusatz von Phenol meist genügte, um einerseits Zersetzungen zu verhüten, andererseits stärkere Titeränderungen bzw. auch Veränderungen der therapeutischen Wirksamkeit auszuschalten. So berichtet Händel von zufriedenstellenden Ergebnissen bei der Haltbarmachung agglutinierender Seren durch Versetzen der Frischsera mit 0,5%iger Karbolsäure. Andere Autoren haben durch Beigabe von Glyzerin ebenfalls gute Erfolge erzielt (Bitter). Augenblicklich werden beide Verfahren von den staatlichen Seruminstituten praktisch zur Konservierung agglutinierender und hämolysierender Seren verwendet. Ein Nachteil der genannten Methoden ist die zuweilen auftretende Beeinträchtigung der Serumklarheit, die sich besonders bei präcipitierenden Seren störend bemerkbar macht (Weidanz).

Ein anderer Weg zur künstlichen Erhaltung der Antikörper ging zurück auf die Erkenntnis, daß die Agglutinine gegen Austrocknung recht unempfindlich waren und daß aufgelöstes Trockenserum die gleichen Agglutinationstiter ergab wie Frischserum. Die zur Anwendung gelangenden Trockenverfahren, wie z. B. die vielfach gebräuchliche über P_2O_5, $CaCl_2$ und anderen hygroskopischen Chemikalien im Exsikkator, hatten jedoch den Nachteil, daß die Seren in einen nur recht schwer löslichen gelatinösen Zustand hineintrockneten (Kolle, Matsuda), der nach etwa 8—10 Monaten einer völligen Unlöslichkeit Platz machte.

Fränkel machte den Versuch, durch Zusatz von gebranntem Glaubersalz das im gelatinösen Trockenserum gebundene Wasser

zu extrahieren, und kam damit zu offenbar brauchbaren Ergebnissen. Auch Stökel hat mit diesem Kunstgriff völlige Auflösung der Trockenseren erzielt.

Immerhin blieb es wünschenswert, einfachere physikalische Trocknungsverfahren an die Hand zu bekommen, welche die obengenannten Nachteile nicht hatten.

Weit schwieriger als die Erhaltung der Immunkörper gestaltete sich die Erhaltung der Komplementeigenschaften von Seren. Je mehr Versuche im Laufe der Zeit über die Komplementfunktion gemacht wurden, desto deutlicher zeigte sich, wie vielfältig die Störungsmöglichkeiten einerseits, wie komplex der Bau der Komplementfunktion andererseits war. Die Unzahl der über dieses Gebiet erschienenen Arbeiten spricht eine beredte Sprache! Trotzdem war es gerade bei den Komplementen, insbesondere dem bei der Wassermannschen Reaktion zur Bedeutung gelangenden Meerschweinchenkomplement, von größter Wichtigkeit, Konservierungsverfahren zu erarbeiten, die es gestatteten, ein standardisiertes, jederzeit bauchbares Komplement zur Verfügung zu haben.

Versuche, durch Zusatz chemischer Mittel eine Konservierung zu erreichen, hatten infolge der oben erwähnten Empfindlichkeit der Komplementfunktion keinen Erfolg. So konnte Friedberger eine Abnahme des Komplementtiters zwar für einige Tage verhindern, indem er dem frischgewonnenen Serum gesättigte Kochsalzlösung beigab, dann trat jedoch ein unaufhaltsamer Wirksamkeitsverlust ein. Ebenso kam auch Massol, der die gleichen Untersuchungen anstellte, zu dem Schluß, daß eine Zuverlässigkeit im Funktionieren des Kochsalz-Komplementes nicht gewährleistet werden könnte.

Die ebenso wie bei den Antikörpern auch hier versuchten verschiedenen Trocknungsverfahren brachten völlig negative Ergebnisse. Friedberger fand, daß die Komplementeigenschaften sich weder durch Trocknen an der freien Luft noch durch Wasserentzug im Exsikkator erhalten ließen.

Verhältnismäßig gute Resultate lieferte die Methode, die von Straub und Gaede veröffentlicht worden war. Die beiden Autoren trockneten das Komplement durch höhere Temperaturen, suchten dabei den infolge Denaturierung bei mehr als 56—58° eintretende Titerverlust dadurch zu verringern, daß sie das zu trocknende Serum der gefährlichen Temperatur nur eine ganz kurze Zeit — einige Minuten, die aber bei feinster Verteilung des Serums im

Trockner zur vollkommenen Trocknung hinreichend waren — aussetzen. Die Arbeiten von Schilf, Pöhlmann, Schmitz, Stern, Frank, Ganz, Gaethgens und Kutznizki über das nach dieser Methode im großen hergestellte Trockenkomplement „Pharmangans" berichten von zum Teil recht guten, zum Teil unbefriedigenden Ergebnissen.

Infolge einer gewissen Unzuverlässigkeit bei den Bindungsreaktionen, die sich bei dem eben angeführten Trockenkomplement nicht vermeiden ließen, war man auch hier bestrebt, bessere und schonendere Trockenverfahren zu entwickeln.

Amerikanische Autoren (Elser, Thomas, Steffen, Flosdorf und Mudd) konstruierten in den Jahren 1933—1935 Trocknungsapparate, die nach einem physikalischen Prinzip arbeiteten, nämlich der Sublimierung von Wasser in Vakuum vom wärmeren zum kälteren Pol.

Graves und Adair konnten mit diesen Apparaten ein in jeder Beziehung einwandfreies Trockenserum herstellen, welches, wie die Arbeiten von Tuft, Wenger und Frankel über Trockenserum Allergene zeigen, für die verschiedenartigsten Reaktionen brauchbar war.

In Deutschland wurde der Gedanke der Vakuum-Kälte-Trocknung zuerst von Sartorius aufgegriffen, der nach den von ihm bei der Trocknung von Antistaphylolysin-Testseren gemachten günstigen Erfahrungen das neue Verfahren an Meerschweinchenkomplement für die Wassermannsche Reaktion, an agglutinierenden Testseren für bestimmte Bakterienstämme im Hygienisch-Bakteriologischen Institut der Militärärztlichen Akademie untersuchen ließ.

Gleichzeitig wurden hier auch Untersuchungen über die Brauchbarkeit von Trockenbakterien angestellt, die durch Phenol- oder Formalinzusatz abgetötet waren. Dabei wurde zur Herstellung die von Siewert sehr ausführlich angegebene Methode angewendet.

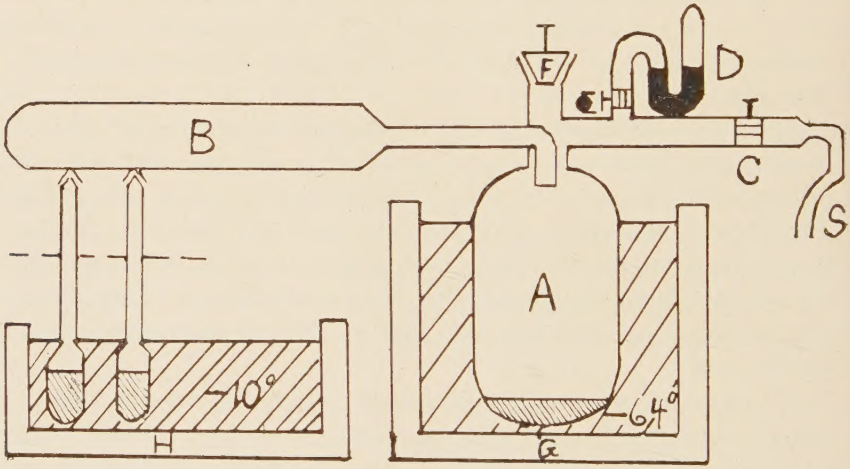
Die Bedeutung von Trockenkomplement, Trockentestseren und Trockenbakterien gerade für die Wehrmacht ist wohl klar ersichtlich: außer der Möglichkeit einer Standardisierung des Komplementes seien hier nur die leichte Transportierbarkeit, Haltbarkeit und jederzeitige Verwendungsfähigkeit erwähnt von Serum und Bakterien, bei letzteren dazu noch die ungefährliche Handhabung. Andererseits sei nur kurz hingewiesen auf die augenblicklich noch immer schwierige Laboratoriums-Tierhaltung und Beförderung unter

Feldverhältnissen, auf die Empfindlichkeit der Serum- und Bakterienkästen beim Transport.

In die Hand eines entsprechend vorgebildeten Truppen-, besonders aber Tropenarztes gegeben, würden Trockenserum- und Bakterien eine bedeutende Entlastung der Untersuchungslaboratorien bedeuten und durch schnellere Klärung fraglicher Diagnosen einer besseren und prompteren Behandlung der Patienten zugute kommen.

Vor der Besprechung der Ergebnisse der hier unternommenen Versuche mit Trockenkomplement, Trockentestserum und Trockenbakterien sei kurz die benutzte Trockenapparatur erläutert. Zur Bakterienherstellung wurde die schon erwähnte Exsikkator-Trocknung nach Siewert in einer Modifikation von Eyer durchgeführt.

Für die Trocknung von Komplement und Testserum kam eine Modifikation des von Flosdorf und Mudd in den oben genannten Arbeiten angegebenen Aggregates zur Anwendung (Abbildung).



Der wichtigste Teil des Trocknungsapparates ist der aus Jenaer Glas gefertigte Kolben „A“ (der ganze Trockner ist wegen der durch die Kältelösungen und das Vakuum entstehenden Druck- und Spannungsdifferenzen aus Jenaer Glas hergestellt). Er steht in einer Kältelösung von —64° C. und dient somit als der oben erwähnte kältere Pol des Trockners, in dem sich das vom Serum herüber sublimierte Wasser sammelt. Irgend eine hygroskopische Substanz befindet sich nicht in Kolben A; das Wasser sammelt sich am Boden

und an den Seitenwänden des Gefäßes als Eis. Um das bei der Trocknung anfallende Wasser nach Abschluß des Vorganges aus dem Kolben entfernen zu können, befindet sich am Ende des Kolbenhalses eine durch den Stopfen „F" verschlossene Oeffnung. An den Kolbenhals ist weiterhin eine durch den Hahn „C" verschließbare Röhre angeschmolzen, die über den Gummischlauch „S" eine Verbindung mit der zur Erzeugung des Vakuums nötigen Saugpumpe herstellt. Durch den Hahn „E" ist das zur Kontrolle des Innendruckes erforderliche Manometer „D" gegen die übrige Apparatur abschließbar. In den Kolbenhals ist schließlich als Ueberleitung zum Anschlußzylinder „B" eine knieförmige Röhre eingeschmolzen. Der Anschlußzylinder „B" dient, wie schon der Name sagt, zum Anbringen der Ampullen mit dem zu trocknenden Stoff am Trockner. Man kann ihn, je nach dem, was für Anforderungen an den Apparat gestellt werden sollen, mit beliebig vielen Oeffnungen zum Anschließen der Ampullen versehen lassen; zur Trocknung kleinerer Mengen wurde hier im Institut ein Zylinder mit 4, in allen übrigen Fällen ein solcher mit 10 Anschlüssen gebraucht. Durch ein genau zur Anschlußöffnung passendes Schliffstück ist jede Ampulle auswechselbar am Zylinder „B" befestigt. Die Ampullen selbst stehen in einer Kältelösung von etwa —10° C.; die Temperatur muß gerade ausreichend sein zum vollständigen Gefrieren des zu trocknenden Materials. Als Kältelösung wurde bei den Versuchen benutzt: Für das Kolbengefäß „G" Propylalkohol, dem jedesmal vor Beginn der Trocknung solange fester Kohlensäureschnee zugesetzt wurde, bis eine Temperatur von etwa —64—68° C erreicht war; die dafür benötigte Menge Kohlensäureschnee betrug bei jeder Trocknung wenig mehr als 1 kg.

Zum Gefrieren des Ampulleninhaltes diente im Gefäß „H" im Tiefkühlschrank vorbehandelte Sole oder ebenfalls gekühlter Propylalkohol.

Das Ansetzen einer Trocknung ging folgendermaßen vor sich: Genau abgemessene Serumquanten wurden in die Ampullen überpipettiert, danach in den Gefäßen zum Gefrieren in den Tiefkühlschrank gestellt (bei —28° C). Nachdem die Kältelösung hergestellt und sämtliche Stopfen usw. gut mit Hahnfett eingerieben waren, wurden die Ampullen mit dem jetzt festen Serum an den Trockner angeschlossen, dann die Saugpumpe zur Vakuumerzeugung angeschaltet. Sobald auf Grund des Manometerstandes das Vakuum vollständig war, wurde der Hahn „C" geschlossen. Nach Ablauf

von etwa 18 Stunden wurden die Ampullen nach erfolgter Trocknung an der durch = = = bezeichneten Stelle mit einer Gasflamme abgeschmolzen. Die Schliffstücke wurden sofort wieder brauchbar gemacht durch Zusammenschmelzen mit Leerampullen.

Bei der nun folgenden Besprechung der eigentlichen Versuche wird zuerst das Ergebnis der Trockenkomplement-Untersuchung behandelt.

Das erforderliche Meerschweinchenserum wurde durch Herzpunktion mehrerer gesunder ausgewachsener männlicher Tiere gewonnen. Es handelte sich also bei den einzelnen Komplementproben bis auf 4 Ausnahmen, bei denen das Verhalten von Einzelkomplementen untersucht werden sollte, immer um Mischkomplemente. Ein geringer Teil des Frischkomplementes wurde bis zur Anstellung der vergleichenden Untersuchungen etwa 18 Stunden lang bei + 3—4° C im Kühlschrank aufbewahrt, der Rest sofort in der oben geschilderten Weise in Mengen von 1—3 ccm pro Ampulle zur Trocknung angesetzt. Da die Ergebnisse hinsichtlich Trocknungs- und Auflösungszeit sowie der sonstigen Eigenschaften bei allen Quanten die gleichen waren, wurden später aus versuchstechnischen Erwägungen heraus je 2 ccm pro Ampulle getrocknet. Beim Abschmelzen der Ampullen mit dem vollständig getrockneten Komplement wurde das Vakuum in den Ampullen belassen. Bei 2 Trockenkomplementproben kam infolge eines Versehens vor dem Zuschmelzen Zimmerluft in die Ampullen. Gegenüber den luftleer verschlossenen Ampullen war anfangs kein Unterschied festzustellen, weder im Bezug auf das Aussehen noch Löslichkeit noch Wirksamkeit. Nach 7 bzw. 9 Wochen zeigten sich jedoch deutliche Differenzen: die Komplementproben in den lufthaltigen Ampullen brauchten zur völligen Auflösung doppelt so lange Zeit wie die im Vakuum aufbewahrten, die Komplementlösung war leicht getrübt, und, was am wesentlichsten war, der Titer war sowohl im Hämolyse- als auch im Ablenkungsversuch deutlich erniedrigt (s. Tabelle 1 und 2).

Hieraus dürfte zu folgern sein, daß es beim Aufbewahren des Trockenkomplementes in lufthaltigen Ampullen und ganz allgemein in freier Luft zu irgendwelchen Veränderungen der Komplement-Struktur kommt im Sinne einer Schädigung der Funktionen.

Das Trockenkomplement war in den Ampullen in feiner kristallinischer Form an den Wänden oder als Kügelchen am Boden angetrocknet. Bei noch nicht ganz vollständiger Trocknung entsprachen Farbe und Konsistenz etwa der des Syrups; zuweilen blieb infolge

nicht feststellbarer Störungen des Trockenvorganges diese Farbe und Konsistenz trotz längerer Belassung im Trockner bestehen. Nachteile gegenüber dem normal getrockneten Komplement ergaben sich nur in bezug auf die Auflösungsgeschwindigkeit, die beim syrupartig getrockneten etwa halb so groß war wie beim normalen.

Zur Auflösung des Trockenkomplementes wurde die der Frischserummenge entsprechende Menge Aqua destillata in die Ampulle hineinpipettiert, also bei einem Trockenkomplement aus 2 ccm Frischserum 2 ccm Wasser. Da bei der Wassermannschen Reaktion entsprechend der allgemeinen Methodik gewöhnlich mit einer Komplementverdünnung 1 : 10 gearbeitet wurde, erfolgte die Herstellung dieser Verdünnung meistens schon vor Auflösung des Trockenkomplementes durch Mischen der entsprechenden Menge Aqua dest. mit 9 Teilen physiologischer Kochsalzlösung. Die Komplementauflösung wurde dann mit diesem Verdünnungsgemisch durchgeführt. Die kleine Ungenauigkeit, die dadurch begangen wurde, daß volle 2 ccm Wasser dem Trockenkomplement zugesetzt wurden, statt nur bis zu einem Quantum von 2 ccm Gesamtflüssigkeit aufzufüllen, wie es ja der ursprünglichen Frischkomplementmenge entsprach, durfte bei der großen Menge des zuzusetzenden Wasser-Kochsalzgemisches vernachlässigt werden.

Andererseits war es ohne Schwierigkeiten durchaus möglich, vom Trockenkomplement eine der ursprünglichen gleichende Konzentration herzustellen, ja sogar noch eine höhere. Das Komplement wurde mit etwa 0,3 ccm Aqua dest. aufgelöst, dann in ein Meßgefäß überpipettiert und durch weiteren Zusatz von Wasser auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

Die Auflösung des Komplementes nach Wasser- bzw. Wasserkochsalzsusatz ging in der Weise vor sich, daß die kristallinische Struktur schnell und vollständig zerfiel, vergleichbar etwa mit der Auflösung von Würfelzucker in Wasser. Es entstand eine klare, durchsichtige, je nach der Farbe des Frischserums gelblich bis bräunlich gefärbte Komplementlösung. Irgendwelche Rückstände waren bei keiner der untersuchten Komplementproben festzustellen. Hinsichtlich der Klarheit der Komplementlösungen ließen nur die oben angeführten lufthaltig gelagerten Ampullen etwas zu wünschen übrig.

Die zur völligen Auflösung erforderliche Zeit betrug für 2 ccm des normalen Trockenkomplementes 2—4 Minuten, bei den länger gelagerten Proben 5—6 Minuten. Im Vergleich hierzu vergegen-

wärtige man sich einmal die Zeit, die bei der Gewinnung von Frischkomplement von der Herzpunktion bis zur Benutzbarkeit im Versuch verstreicht.

Bei der Auswertung der Trockenkomplemente wurden die Versuche in zwei Gruppen gegliedert. Die erste Gruppe sollte einen allgemeinen Ueberblick über die wesentlichen Eigenschaften des Trockenkomplementes vermitteln, die zweite sollte die gewonnenen Ergebnisse nochmals kontrollieren.

Jede Gruppe umfaßte

1. eine Ambozeptorauswertung,
2. eine Komplementauswertung mit und ohne Extraktzusätzen,
3. einen WaR-Hauptversuch mit negativen und positiven Seren.

Die Ambozeptorauswertung, der Vorversuch A, wurde in üblicher Weise angesetzt mit Ambozeptorverdünnungen steigend von 1 : 500 um je 1 : 500 bis 1 : 6000 und einer 10%igen Komplementverdünnung zu gleichen Teilen. Die noch völlig lösende Dosis wurde bis auf die weiter unten erwähnten Ausnahmen nach 35—40 Minuten Aufenthalt im Brutschrank bei 37° C ermittelt. Der Vorversuch B, die Komplementauswertung, wurde nach den Angaben von Richter und Manteufel durchgeführt. Angefangen vom 10%igen Komplement wurde bis zu einer Verdünnung von 2% herunter festgestellt, welche Komplementmenge noch ausreichend war, um mit der Ambozeptorgebrauchsdosis, jedem der drei Extrakte, negativem Serum und den Schafblutkörpern eine komplette Hämolyse zu erreichen. Als Kontrolle wurde eine Reihe aufgestellt, in der die Extrakte durch Kochsalzlösung ersetzt waren. Als Bindungszeit wurden auch hier 40 Minuten Brutschrank gewählt, die mit geringen Schwankungen ausreichende Hämolyse zeitigten.

Im Hauptversuch wurde, da die bei der Komplementauswertung ermittelten Werte im allgemeinen nur wenig unter 10% lagen, der Einfachheit halber mit einer Komplementverdünnung 1 : 10 gearbeitet. Nur in einem Fall reichte die 10%ige Verdünnung nicht mehr aus, so daß mit 20%iger Lösung der Versuch wiederholt werden mußte.

Was die Ambozepterauswertung der ersten Gruppe anbelangt, so wurden hierbei 5 an verschiedenen Tagen gewonnene Mischkomplemente im Frischzustand, d. h. 18 Stunden nach der Herz-

punktion, und gleichzeitig sofort nach der Trocknung untersucht. Die bei dieser Reaktion benutzten Substanzen — Schafblutkörper, menschliche Sera und Ambozeptor — waren vollkommen gleich, so daß möglicherweise zwischen Frisch- und Trockenkomplement auftretende Differenzen nicht durch die mitreagierenden Substanzen bedingt sein konnten. Nach 20—30 Tagen wurden die Komplemente nochmals geprüft, bei 2 Proben wurde die Auswertung nach 2 und etwa 3 Monaten wiederholt. Die Ergebnisse der vier letztgenannten Auswertungen und ihre Beziehungen zu den ersten Werten dürften wohl den Schluß zulassen, ob überhaupt und für wie lange Zeit mit der angewandten Trocknungsmethode eine Konservierung brauchbaren Komplementes möglich ist.

Die Ergebnisse der Ambozeptorauswertungen sind nach Versuchstagen geordnet aus der Tabelle 1 zu ersehen.

Tabelle 1.

Komplement	28. 3.	1. 4.	5. 4.	9. 4.	17. 4.	30. 4.	29. 5.	2. 7.
FriK „A“	4000							
TroK „A“	3500	3000			5000			
FriK „B“		4000						
TroK „B“		3500	4000			4500		
FriK „C“			5000					
TroK „C“			4000				2000	1500
FriK „D“				4000				
TroK „D“				2000			2000	500
FriK „E“						5000		
TroK „E“						6000	2500	1500
FriK - Kontr.					5000			
„ „							4000	
„ „								2000

Erklärung: Die Zahlen geben die Ambozeptorverdünnung an, welche mit einer 10%igen Komplementverdünnung komplette Hämolyse ergab.

Dazu ist zu bemerken, daß bei den Auswertungen am 2. 7. ein anderer Ambozeptor angewandt wurde, der offenbar nicht die hämolytischen Eigenschaften besaß wie der an den übrigen Versuchstagen gebrauchte. Dies machte sich auch bei den späteren Komplementuntersuchungen (Tabelle III) bemerkbar.

Sämtliche länger gelagerten Trockenkomplemente benötigten zur Hämolyse mehr Zeit im Brutschrank als die entsprechenden Frischkomplemente; bei den in lufthaltigen Ampullen konservierten Versuchsnummern „D" und „E" waren sogar bis zu 30 Minuten erforderlich.

Wie aus der Tabelle I hervorgeht, zeigten die Komplemente „A", „B", „C" und „E" kurz nach der Trocknung bei der ersten Untersuchung nur unwesentliche Veränderungen im Titer gegenüber dem Frischkomplement, sei es, daß sie um einen Verdünnungsgrad höher oder aber tiefer lagen. Das Komplement „D" dagegen hatte schon sofort nach der Trocknung die Hälfte seiner hämolytischen Kraft eingebüßt. Ein besonderer Grund dafür ließ sich nicht erkennen. Da das getrocknete Komplement „D" nicht unter Vakuum gelagert war, hätte man vermuten können, daß dies der Grund für das Nachlassen des Titers gewesen sei. Jedoch steht dem gegenüber, daß das ebenfalls nicht im Vakuum aufbewahrte Komplement „E" bei der ersten Prüfung sogar einen höheren Titer als das Frischkomplement zeigte. Dies sprach dafür, daß der schädigende Einfluß der Luft sich noch nicht nach einem Tage bemerkbar machen konnte. „D" dürfte also während des Trockenvorganges von irgend welchen Schädigungen getroffen worden sein, dies sich nach Beendigung der Trocknung nicht mehr auffinden ließen. Bei den später angestellten Titrationen mit länger gelagertem Komplement machte sich der Lufteinfluß bei „D" und „E" dann aber doch recht nachteilig bemerkbar; dies zeigen die Werte vom 29. 5. und 2. 7.: Während A und B sogar einen höheren Titer aufweisen — der aber wohl in geringerer Resistenz des Schafblutes oder in sonstigen unspezifischen Faktoren seine Erklärung finden dürfte, da zwischendurch auch bei A ein Abfall festzustellen war — fielen E und D steil ab. Unerklärlich blieb das starke Absinken von C; nachdem aber der niedere Titer am 28. 5. erreicht war, hielt er sich unverändert bis zum 2. 7. Demnach war die Annahme berechtigt, daß der Titerwert sich auch weiter so halten würde.

Im Gegensatz zu den nicht ganz einheitlichen Werten der Ambozeptortitration ergab sich bei der Komplementauswertung eine größere Einheitlichkeit.

Mit der 4fachen Menge der nach Vorversuch A erforderlichen Ambozeptordosis ergaben sich im Vorversuch B die aus der Tabelle II ersichtlichen Werte.

Tabelle II.

Komplement	28. 3.	1. 4.	5. 4.	9. 4.	17. 4.	30. 4.	29. 5.	2. 7.
FriK „A“	7 : 9							
TroK „A“	8 : 10	7 : 9			7 : 9			
FriK „B“		6 : 7						
TroK „B“		7 : 8	6 : 8			6 : 8		
FriK „C“			2 : 6					
TroK „C“			3 : 6				7 : 10	5 : 7
FriK „D“				8 : 9				
TroK „D“				6 : 8			9 : 12	9 : 10
FriK „E“						5 : 8		
TroK „E“						6 : 9	6 : 9	6 : 8
FriK - Kontr.					5 : 7			
„ „							4 : 5	
„ „								3 : 5

Erklärung: Die Ziffern bedeuten diejenigen Verdünnungsstufen des Komplementes in Prozent, mit denen noch in der oben angegebenen Versuchsanordnung komplette Hämolyse erfolgte. Die ersten Ziffern geben die Werte der extraktlosen, die zweiten die Durchschnittswerte der Extraktreihen wieder.

Die eigenhemmende Wirkung der luetischen Extrakte verursachte demnach eine Erhöhung der zur Hämolyse erforderlichen Komplementdosis um durchschnittlich 2—3 Verdünnungsstufen.

Die Aufstellung gibt weiterhin zu erkennen, daß die Bindungsfähigkeit nur geringe Schwankungen aufwies. Sie betrugen im Höchstfall 4% und hatten dadurch nur im Fall D einen störenden Einfluß auf den Versuchsablauf insofern, als nicht mehr die übliche 10%ige Verdünnung benutzt werden konnte. Mit anderen Worten: Bei keinem der Trockenkomplemente ging mit dem Absinken des Ambozeptortitaers auch ein solches der Bindungsfähigkeit einher. Eine verlangsamte Hämolyse, wie sie im Vorversuch A bei fast allen Trockenkomplementen zu sehen war, wurde im Vorversuch B nur bei den Proben „D“ und „E“ beobachtet, und auch hier waren nur weitere 10, höchstens 15 Minuten nötig.

Nachdem die Bindungsfähigkeit des Komplementes jeweils recht genau festgestellt worden war, war der befriedigende Ausfall des Hauptversuches sicher gestellt. Mit den positiven Menschenseren, gleichgültig, ob sie + oder +++ waren, gab es bei sämtlichen Trockenkomplementen eine Hemmung der Lyse, wie sie auch bei

den Frischkomplementen nicht besser war. Die Kontrollen waren ebenfalls immer einwandfrei. Von der Versuchsnummer D wurde am 29. 5. auf Grund des Vorversuchs eine 20%ige Verdünnung benutzt, die dann gleichfalls ein normales Resultat lieferte.

Zur Nachprüfung der Ergebnisse aus der ersten Versuchsgruppe wurden 2mal je 4 gleichzeitig gewonnene Komplemente getrocknet, um an ihnen in der gleichen Versuchsanordnung in erster Linie die Schwankungen bei der Ambozeptorauswertung zu beobachten. Dabei wurden je 2 Misch- und 2 Einzelkomplemente zur Trocknung angesetzt.

Die bei der Ambozeptortitration abgelesenen Werte bringt die Tabelle III.

Daraus geht klar hervor, daß alle Trockenkomplemente gegenüber dem Frischserum einen mäßigen Wirksamkeitsabfall aufwiesen, der sich bei den ersten vier stärker als bei den übrigen bemerkbar machte. Ein Unterschied im Verhalten der Einzelkomplemente 1, 2, 5 und 6 gegenüber den Mischkomplementen war aus diesen Ergebnissen generell nicht abzuleiten; in der ersten Gruppe hatten die Einzelkomplemente sich besser als die Mischkomplemente gehalten, in der zweiten Gruppe waren beide gleich stark gefallen.

Tabelle III.

Komplement	13. 6.	14. 6.	15. 6.	16. 6.	2. 7.	3. 7.
FriK „1“	4500					
TroK „1“			2500		2500	
FriK „2“	4500					
TroK „2“			2500		2500	
FriK „3“	4000					
TroK „3“			3000		2000	
FriK „4“	3500					
TroK „4“			2500		1500	
FriK „5“		2500				
TroK „5“					2000	1000
FriK „6“		2000				
TroK „6“					2500	1500
FriK „7“		2500				
TroK „7“					2500	1500
FriK „8“		2500				
TroK „8“					2500	1500

Erklärung: s. Tabelle I.

Bei der Auswertung der Komplemente der 2. Versuchsgruppe (Tabelle IV) wurden die schon gemachten Erfahrungen bestätigt, nämlich daß sich das Bindungsvermögen der Trockenkomplemente unabhängig vom Sinken des Ambozeptortiters fast unverändert konservierte; die aufgetretenen geringen Schwankungen werden wohl auf unspezifische Faktoren zurückzuführen gewesen sein.

Tabelle IV.

Komplement	13. 6.	14. 6.	15. 6.	16. 6.	2. 7.	3. 7.
FriK „1“	2 : 6					
TroK „1“			2 : 5		3 : 6	
FriK „2“	2 : 4					
TroK „2“			2 : 4		4 : 6	
FriK „3“	2 : 5					
TroK „3“			2 : 4		2 : 5	
FriK „4“	2 : 5					
TroK „4“			2 : 6		4 : 7	
FriK „5“		3 : 5				
TroK „5“				5 : 8		4 : 7
FriK „6“		4 : 6				
TroK „6“				5 : 8		4 : 6
FriK „7“		2 : 5				
TroK „7“				3 : 6		4 : 5
FriK „8“		2 : 5				
TroK „8“				3 : 6		4 : 6

Die Hauptversuche führten, wie nicht anders zu erwarten, ausschließlich zu sehr guten Resultaten: Die Röhrchen mit den positiven Seren wiesen bei allen Trockenkomplementen und mit sämtlichen Extrakten vollständige Hemmung der Lyse auf. Die negativen Seren sowie die Kontrollen waren jedesmal komplett gelöst.

Trotz der für sich sprechenden Hauptversuchsergebnisse dürfte es ratsam sein, in einem größeren Rahmen und besonders gegenüber schwach positiven Seren das Trockenkomplement auf unbedingte Zuverlässigkeit zu prüfen. Nach den geschilderten Erfahrungen ist anzunehmen, daß es auch in kritischen Fällen einwandfrei arbeitet. Zu berücksichtigen ist jedoch immer die Möglichkeit einer Verlangsamung der Hämolyse, wie sie bei allen Trockenkomplementen, den älteren stärker als den neuen, beobachtet worden war.

Im Anschluß an die bisher besprochenen Versuche mit Trockenkomplement wurden weiterhin Versuche mit getrockneten Testseren

für den Agglutinationsversuch angestellt. Die Seren wurden dabei in der gleichen Weise, wie oben bei den Komplementen geschildert, zur Trocknung angesetzt, jedoch wegen der bei den Untersuchungen geringen jeweils benötigten Menge nur 1 ccm Serum pro Ampulle.

Die Beschaffung der zu trocknenden Seren erfolgte durch Entnahme aus den Originalflaschen der Herstellerwerke, d. h. es wurden Seren getrocknet, die bereits durch Zusatz eines chemischen Konservierungsmittels haltbar gemacht waren. Nur zwei agglutinierende Sera, die im hiesigen Institut hergestellt worden waren, wurden unvermischt getrocknet. Hinsichtlich des Trocknungsergebnisses unterschied sich das Testserum in keiner Weise vom Trockenkomplement, weder in bezug auf das Aussehen noch auf die Löslichkeit.

Die Untersuchung der Trockenbakterien, die gleichzeitig mit der des Serums vorgenommen wurde, beschränkte sich von vornherein auf das Arbeiten mit durch Karbol oder Formol abgetöteten Bakterien.

Die Frage, wieweit ein neuerliches Wachstum einmal getrocknetaer lebender Keime möglich ist, wurde von anderer Seite bereits geprüft und dabei keine zufriedenstellende Ergebnisse erzielt (F i c k e r). Freilich war das von F. geübte Trockenverfahren anders, als das hier verwendete.

Die Herstellung der Trockenbakterien ging im Einzelnen folgendermaßen vor sich: Von den zu untersuchenden Stämmen — neun Ruhrstämmen (aus der Tabelle VI ersichtlich), Proteus OX 19, Typhus, einem Paratyphus-B-Stamm und einem Abortus-Bang-Stamm (Tabelle V) — wurden große Agarplatten angelegt. Nach 24stündigem Bewachsen im Brutschrank wurden die Platten mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt, dann die Abschwemmung 20 Minuten zentrifugiert und mehrmals mit Kochsalzlösung nachgewaschen. Der Bodensatz wurde mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, die einen 0,5%igen Formalin- bzw. Phenolzusatz hatte. Dieser Formalin- bzw. Phenolgehalt reichte bei sämtlichen Stämmen zur Abtötung aus, wie durch jedesmal angestellte Wachstums- oder Sterilitätskontrollen festgestellt werden konnte. Die Bakterienaufschwemmung kam für 24 Stunden in den Brutschrank und wurde dann abzentrifugiert. Der erhaltene Bodensatz wurde nach dem von Eyer hier im Institut entwickelten Verfahren getrocknet. Als Trocknungsapparat wurde ein Exsikkator mit konzentrierter Schwefelsäure verwendet. Die Bakterienmasse

wurde in großen Zentrifugengläsern im Tiefkühlschrank eingefroren und in den Exsikkator hineingesetzt, ein Vakuum erzeugt und alsdann der Exsikkator bis zur völligen Trocknung der Bakterien — etwa 24 Stunden — in den Tiefkühlschrank gestellt. Die getrocknete Bakterienmasse wurde fein zerrieben und in verkorkten Reagenzgläsern aufbewahrt.

Zur Auflösung der Bakterien wurde eine kleine Menge des Bakterienpulvers mit Kochsalzlösung versetzt, gut gemischt und dann die entstandene Suspension filtriert, um sich nicht lösende Partikel zurückzuhalten. Die Opaleszenz des Filtrates war natürlich abhängig von der in ihm enthaltenen Bakterienmenge. Es wurde angestrebt, bei den Trockenbakterien immer möglichst den gleichen Trübungsgrad wie in der Suspension der Frischbakterien herzustellen, um zu vermeiden, daß durch Zusatz einer wechselnden Zahl Keime falsche Ergebnisse bei den ja nach quantitativen Gesetzmäßigkeiten erfolgenden Agglutinationen herauskämen.

Die Suspendierbarkeit der Formalin- und der Karbolbakterien war recht verschieden. Die ersten Trockenbakterienversuche wurden hier ausschließlich mit Formalinbakterien gemacht. Dabei zeigte sich, daß ein Stamm (Leipzig 153) sich so gut wie gar nicht löste, so daß keine Agglutinationen mit ihm angesetzt werden konnten. Die übrigen Stämme lösten sich zwar, jedoch nicht gleichmäßig gut. Besonders störend war, daß die Bakterien-Kochsalzkontrollen bei den Agglutinationen auch von ganz frisch bereiteten Lösungen eine geringe Spontanagglutination zeigten. Dadurch wurde eine genaue Ablesung des Testserumtiters nahezu unmöglich gemacht.

Die daraufhin unternommenen Versuche, durch Auflösen der Bakterien mit Kochsalzlösung bei 37° und 52° sowie mit einer 1%igen Soda-Kochsalzlösung ebenfalls bei 52 und 37° im Wasserbad eine Homogenität der Bakterienkontrollen zu erreichen, schlugen fehl: die Spontanagglutination war eher noch stärker, der Stamm Leipzig 153 zeigte keine Neigung zur Lösung.

Dagegen waren die Ergebnisse hinsichtlich der Suspendierbarkeit mit den anschließend untersuchten Phenol-Bakterien durchaus befriedigend. Sämtliche Stämme, auch Leipzig 153, ließen sich ohne Schwierigkeiten aufschwemmen. Die Bakterien-Kochsalz-Kontrollen waren absolut homogen.

Bei den Agglutinationsversuchen wurden von jedem Stamm 4 Reihen mit fallenden Serummengen angesetzt:

1. Reihe: Frischbakterien und Frischserum (d. h. den Originalflaschen frisch entnommenem Serum),
2. Reihe: Trockenbakterien und Frischserum,
3. Reihe: Frischbakterien und Trockenserum,
4. Reihe: Trckenbakterien und Trockenserum.

Für die eingangs erwähnten Verwendungsmöglichkeiten haben die 2. und 3. Reihe praktische Bedeutung, während die beiden anderen nur als Kontrollen mit angesetzt wurden. Die bei den Agglutinationen ermittelten Werte bringen die Tabellen V und VI.

Tabelle V.

Dat.	Bakterien Stamm	abgetötet mit	Agglutination vorhanden mit bis zur Serumverdünnung 1 :			
			FriS+FriB	FriS+TroB	TroS+FriB	TroS+TroB
15. 4.	Proteus	Formol	1 600	1 600	1 600	800
23. 4.	Proteus	Formol	12 800	6 400 Spur	6 400	6 400 Spur
9. 7.	Proteus	Phenol	6 400	3 200	6 400 Spur	1 600
10. 6.	Typhus	Formol	25 600	25 600 Spur	25 600	25 600 Spur
10. 6.	Typhus	Phenol	25 600	6 400	25 600	2 200
9. 7.	Bang	Formol	3 200 Spur	3 200 Spur	1 600	1 600
9. 7.	Bang	Phenol	3 200 Spur	1 600 Spur	1,600	1 600 Spur
9. 7.	Breslau	Phenol	800	3 200	800	3 200 Spur
9. 7.	Breslau	Formol	800	800	800	800

Was die Ergebnisse mit dem Trockenserum anbelangt, so ist ganz klar zu erkennen, daß die Agglutinine durch den Trocknungsprozeß keine Schädigung erlitten hatten. Dabei war es gleichgültig, ob die Trockenseren im Vakuum konserviert waren oder nicht; so zeigten die Seren aus den nach Luftzutritt zugeschmolzenen Ampullen, „Po 19", „Proteus" und „Typhus" die gleichen Titerverhältnisse wie die restlichen, in luftleer verschlossenen Ampullen gelagerten.

Tabelle VI.

Dat.	Bakterien Stamm	abgetötet mit	Ablesbare Agglutination mit bis zur Serumverdünnung 1: FriS+FriB	FriS+TroB	TroS+TriB	TroS+TroB
15. 4.	Essen 836	Formol	25 600	25 600	25 600	25 600
23. 4.	Essen 836	Formol	25 600	25 600	25 600	12 800
27. 5.	Essen 836	Phenol	25 000	25 600 Spur	25 600	12 800 Spur
15. 4.	Essen 1000	Formol	25 600	12 800	25 600	25 600 Spur
27. 5.	Essen 1000	Phenol	25 600	25 600	25 600	25 600
15. 4.	Schmitz-Nigeria	Formol	400	400	400	400 Spur
23. 4.	Schmitz-Nigeria	Formol	1 600	700	800	400
27. 5.	Schmitz-Nigeria	Phenol	800	800	800	800
15. 4.	Flexner RGA	Formol	25 600	6 400	25 600	2 200
23. 4.	Flexner RGA	Formol	25 600	25 600	25 600	25 600
27. 5.	Flexner RGA	Phenol	25 600	25 600	25 600	25 600
15. 4.	Flexner Ditthorn	Formol	25 600	25 600	25 600	25 600
27. 5.	Flexner Ditthorn	Phenol	12 800	12 800	12 800	12 800
15. 4.	Flexner A 24	Formol	6 400	1 600	6 400	1 600
23. 4.	Flexner A 24	Formol	25 600	25 600 Spur	25 600	6 400
27. 5.	Flexner A 24	Phenol	25 600	12 800	25 600	6 400
10. 6.	Leipzig 153	Phenol	25 600	25 600 Spur	25 600	12 800 Spur
12. 5.	Poona 19	Phenol	12 800	3 200	25 600 Spur	3 200
24. 6.	Poona 19	Phenol	6 400	6 400	6 400 Spur	6 400

Das Verhalten von „Po 19“, welches hier im Institut hergestellt worden war und ohne jeglichen Konservierungszusatz getrocknet war, bewies, daß es sehr gut möglich ist, durch das neue Trocknungsverfahren Testseren auch unvermischt mit Chemikalien längere Zeit voll verwendungsfähig zu erhalten. Leider standen im Augenblick keine weiteren Testseren ohne Konservierungszusatz zur Verfügung, um diesen Schluß zu bestätigen.

Zu den Agglutinationsergebnissen mit den Trockenbakterien war bereits oben erwähnt, daß infolge der Spontanagglutination der Formalinbeakterien nur ein ungefähres Ablesen der geringsten zur Agglutination ausreichenden Serummenge möglich war; die angegebenen Werte sind also ungenau.

Bei den homogen suspendierten Phenolbakterien zeigte sich, daß durch die Trocknung ein Sinken der Titerhöhe des Serums um durchschnittlich 1—2 Röhrchen verursacht wurde. Am deutlichsten war die Differenz beim Typhusstamm; vielleicht war die Ursache bei ihm in einer größeren Empfindlichkeit der begeißelten Bakterien gegen Phenol zu suchen.

Besonders aus der 4. Reihe — TroS+TroB — wo evtl. schädigende Einflüsse bei der Trocknung von Serum und Bakterien sich ja addieren mußten, geht klar hervor, daß die Trockenbakterien eine etwas verminderte Agglutinierbarkeit aufwiesen. Für eine Aenderung der Agglutinationsform sprach auch die Tatsache, daß die Trockenbakterien aller untersuchten Stämme viel feiner zusammengeballt wurden als die entsprechenden Frischbakterien. Eine Behinderung der Ablesbarkeit des Titers trat dadurch jedoch nicht ein.

Trotz des bei den Phenol-Bakterien feststellbaren Titerabsinkens ist aus den geschilderten Versuchen der Schluß zu ziehen, daß die Agglutination mit Trockenbakterien durchaus brauchbare Resultate liefert.

Zusammenfassung.

1. Durch die Methode der Vakuum-Kälte-Trocknung läßt sich ein Trockenkomplement herstellen, welches gut lagerbar ist und längere Zeit (mindestens 3 Monate) zur WaR verwendbar ist.

2. Ein im gleichen Verfahren hergestelltes Trockentestserum zeigt sich, gleichgültig ob mit oder ohne chemischen Konservierungszusatz getrocknet, wiederstandsfähig gegen thermische und klimatische Einflüsse und läßt sich ohne Nachteil an Stelle des üblichen mit Phenol konservierten Immunserums verwenden.

3. Mit Phenol abgetötete Trockenbakterien ergeben bei Agglutinationen mit Frisch- und Trocken-Testseren gut ablesbare Titerwerte, die den praktischen Anforderungen vollauf genügen.

Literatur.

1. Adair and Graves: Journal of hygieny 39 (1939), p. 43.
2. Bitter: Zentralbl. f. Bakt. O. 87, S. 560.
3. Blumental & Bermann: Zeitschr. f. Hygiene 107 (1927), S. 161.
4. Elser, Thomas and Steffen: Journal of immun. 28, p. 433.
5. Ficker: Zeitschr. f. Hygiene 59, 1908, S. 367.
6. Flosdorf and Mudd: ,ournal of immun. 26 (1934), p. 341.
7. — Journal of immun. 29 (1935), p. 389.
8. Fränkel, Elfer: Biochem. Zeitschr. 28 (1910), S. 530.
9. Frankel, Tulfd and Wenger: Journal of Allergy 10, p. 27.
10. Friedberger: Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 41.
11. Ganz: Zentralbl. f. Bakt. O. 101, S. 225.
12. Gaede & Straub: Biochem. Zeitschr. Nr. 165, S. 347.
13. Gaethgens: Zentralbl. f. Bakt. O. 99, S. 171.
14. Hartley: Bull. Trimestr. Org. Hyg. 5 (1936), p. 798.
15. Händel: Zentralbl. f. Bakt. R. 42, Anhg. S. 171.
16. Kolle-Wassermann: Handb. d. path. Mikroorg..
17. Kuznitzky: Klin. Wochenschr. 1925, S. 923.
18. Lichtenstein: Journal of Allergy. 4 (1933), p. 239.
19. Manteuffel & Richter: Zentralbl. f. Bakt. O. 99, S. 62.
20. Massol: C. r. Soc. de Biol. T. 69, 1910, p. 430.
21. Matsuda: Zentralbl. f. Bakt. O. 75, S. 83.
22. Pokorna: Ces. derm. 1925, p. 230.
23. Pöhlmann: Münch. med. Wochenschr. 1925, S. 222.
24. Pollak: Voj, Zdraw. L. 1925, p. 140.
25. Romanow: Zeitschr. f. Emmunitätsforsch. 35, 1925, S. 74.
26. Sartorius & Hertel: Bruns Beiträge z. klin. Chir. 1939, S. 169.
27. Scherp and Hughes: Journal of immun. 36 (1939), p. 29.
28. Schilf: Centralbl. f. Bakt. O. 92, S. 438.
29. Schmitz: Centralbl. f. Bakt. O. 94, S. 177.
30. Siewert: Centralbl. f. Bakt. O. 55, S. 81.
31. Stern: Dtsch. med. Wochenschr. 1925, S. 396.
32. Stern & Frank: ebendort, S. 1858.
33. Stökel: Wiener Klin. Wochenschr. 43 (1910), S. 1513.
34. Swift: Journal of Exper. Med. 33 (1921), p. 69.
35. — Journal of Bakt. 33 (1937), p. 411.

Lebenslauf.

Ich wurde am 18. September 1917 zu Velgast (Kr. Franzburg-Barth) als 3. Sohn des Pastors Malte Karitzky und seiner Ehefrau Marianne geb. Heinemann geboren.

Nach 3 Jahren Volkschulbesuch zu Velgast und Stralsund kam ich Ostern 1927 in die Sexta des humanistischen Gymnasiums zu Stralsund. Die Reifeprüfung bestand ich am 14. Dezember 1935 an der gleichen Anstalt mit Auszeichnung. Nach 3 Monaten Arbeitsdienst trat ich am 1. April 1936 als Fahnenjunker (im San.-Korps) ins Heer ein.

Das medizinische Studium begann ich mit dem Sommersemester 1936 in Rostock. Am 8. Juli 1938 legte ich die medizinische Vorprüfung in Berlin mit „Gut" ab. Nach 2semestrigem Studium in München und Kiel wurde ich bis Ende 1939 zu einer Sanitätseinheit des Feldheeres kommandiert. Während der beiden ersten Trimester 1940 studierte ich wieder in Berlin und meldete mich im Anschluß an ein weiteres Kommando zum Feldheer während des 1. Trimesters 1941 zur medizinischen Staatsprüfung in Berlin. Diese begann ich am 5. März 1941 und werde ich voraussichtlich Ende Mai 1941 beenden.